

1320

JP06277073A

MicroPatent Report

GENE DNA CODING FOR TRANSLOCATION MACHINERY OF PROTEIN

<p>[71] Applicant: MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD</p> <p>[72] Inventors: ASAI YOKO; KOBAYASHI MIKI; YUGAWA HIDEAKI</p> <p>[21] Application No.: JP05071767</p> <p>[22] Filed: 19930330</p> <p>[43] Published: 19941004</p> <p><u>Go to Fulltext</u></p>	<pre> CTC GGA GAA CTC CTC AAG GTT ATT TGG CGT ACT GAG CGC GAG AGC GTC AAG TAA 41 GAT GAT TAT AAG GAG TAT TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA 1 AGC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 42 GAT GAT TAT AAG GAG TAT TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA 2 GAT GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 43 GAT GAT TAT AAG GAG TAT TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA 3 AGC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 44 GAT GAT TAT AAG GAG TAT TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA 4 </pre>
<p>[57] Abstract: PURPOSE: To provide a new gene DNA useful for the production of secretory protein, etc. CONSTITUTION: A gene DNA originated from coryneform bacteria and coding for a translocation machinery of protein. It can be produced e.g. by cutting a chromosome DNA of a cultured coryneform bacteria such as <i>Brevibacterium flavum</i> MJ-233 (FERM BP-1497) with proper restriction enzymes and separating the objective DNA from the cut fragments.</p> <p>[51] Int'l Class: C12N01577 C12N00121 C12N01531 C12N01577 C12R00113 C12N00121 C12R00113</p>	



(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-277073

(43)公開日 平成6年(1994)10月4日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/77	Z N A	7236-4B		
1/21				
15/31				
// (C 1 2 N 15/77		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		審査請求 未請求	請求項の数 8	OL (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-71767

(22)出願日 平成5年(1993)3月30日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 浅井 陽子

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 曾我 道照 (外6名)

(54)【発明の名称】 蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNA

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233からセックイー(secE)遺伝子DNAを単離し、該遺伝子の塩基配列を決定すると共に、該遺伝子を含むDNAを有するコリネ型細菌内で安定なプラスミドpCRY30-secEを構築した。

【効果】 該プラスミドを用いて形質転換されたコリネ型細菌を用いることで、従来よりも高効率に有用微生物産物を生産することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌に由来し蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする、遺伝子DNA。

【請求項2】 前記コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-2333であ

GTGGGAGAAG TCCGTAAGGT TATTGGCCT ACTGCGCGCC AGATGGTCAC GTACACCCCT 60
GTGGTTTGG GATTTTGTAT TGTTTGACC GCTTTGGTGT CTGGTGTGGA TTCTCTAGCT 120
GGTCTTGGAG TTGAGAAGAT TCTGACTCCG TAG 153

【請求項5】 下記アミノ酸配列を含む蛋白質をコード する、請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNA：

Val Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln Met Val Thr Tyr
1 5 10 15
Thr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Val Ser Gly Val
20 25 30 35
Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Val Glu Lys Ile Leu Thr Pro
40 45 50

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAを導入した、組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAおよびコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する、請求項6に記載の組換えプラスミド。

【請求項8】 請求項6または7に記載の組換えプラスミドを保有する、コリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コリネ型細菌に由来し蛋白質のトランスロケーションに関与する遺伝子DNA、特に蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNAに関する。さらに詳しくは、蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子群の中でも重要な遺伝子の一つであるセックイー (secE) 遺伝子に関する。ここで、トランスロケーションマシナリーとは、膜蛋白質および分泌蛋白質各々が細胞膜に組み込まれる過程、あるいは菌体外に分泌される過程において必要不可欠な蛋白質群であり、本発明に言う「蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNA」は、蛋白質のトランスロケーションマシナリーを構成する蛋白質をコードする遺伝子DNAを意味する。以上の如く、secE遺伝子は蛋白質のトランスロケーションが行われる過程において重要な遺伝子の一つであり、さらには必要不可欠な遺伝子であると報告されている (薬学雑誌, 112, (6), 349, 1992)。従って、該遺伝子を高度に発現させることにより蛋白質のトランスロケーション効率が向上し、例えば有用な膜蛋白質および分泌蛋白質等の量的増加が図れるものと期待される。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質のトランスロケーション機構については、主としてエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を材料として研究が進められており [Annual Review

Genetics, 24, 215-248, 1990; Annual Review of Biochemistry, 60, 101-124, 1991]、蛋白質のトランスロケーションに関与する遺伝子として、secA [Journal of Bacteriology, 150, 686-691, 1982]、secB [Journal of Bacteriology, 154, 254-260, 1983]、secD [Journal of Bacteriology, 169, 1286-1290, 1987]、secE [Genetics, 118, 571-579, 1988]、secF [EMBO Journal, 9, 3209-3216, 1990]、secY [Nucleic Acids Research, 11, 2599-2616, 1983]等が報告されている。また、エシェリヒア・コリの各種変異株を用いた研究により、これら遺伝子群の中でもsecA、EおよびY遺伝子が蛋白質のトランスロケーションにおいて特に重要な役割を演じていることが示されている。現在のところ、secE遺伝子についてはエシェリヒア・コリ由来の遺伝子 [Genetics, 118, 571-579, 1988 参照]、およびバチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 由来の遺伝子 [日本農芸化学会誌, 67(02), p137, 1993 参照] の単離は報告されているものの、産業上極めて重要な細菌であるコリネ型細菌由来のsecE遺伝子については報告されていない。

【請求項3】 セックイー (secE) 遺伝子を含む、請求項1に記載の遺伝子DNA。

【請求項4】 下記塩基配列で示される、請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子DNA：

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 トランスロケーションマシナリーの利用例の1つとして、例えばコリネ型細菌を用いた分泌型蛋白質の生産が挙げられる。しかしながら、コリネ型細菌由来のトランスロケーションマシナリーについての知見が少ないこと、および他種に由来するトランスロケーションマシナリーはコリネ型細菌中で十分に機能しないことが示唆されていることから [Molecular Microbiology, 4, 305-314, 1990; FEBS Letters, 273, 75-78, 1990 参照]、実際に工業的生産において利用することは不可能であった。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記問題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、トランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNA群に属するsec

c E 遺伝子 DNA を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。かくして本発明によれば、(1) コリネ型細菌に由来し蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子 DNA、(2) 該遺伝子 DNA が導入された組換えプラスミド、及び(3) 該組換えプラスミドを保有するコリネ型細菌、が提供される。以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0005】蛋白質のトランスロケーションマシナリーを構成する蛋白質群をコードする遺伝子 DNA 群の一つである s e c E 遺伝子 DNA を含む DNA 断片 (以下これを「A断片」と略称することがある) を、コリネ型細菌から調製する基本操作の一例を以下に述べる: s e c E 遺伝子 DNA を含む DNA 断片 (A断片) は、上記コリネ型細菌、例えば *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在するので、該菌株の染色体を適当な制限酵素で切断して生じる切断断片の中から分離取得することができる。

【0006】具体的には、先ず *Brevibacterium*・フラバム MJ-233 株の培養物から常法により染色体 DNA を抽出する。次いで、得られた染色体 DNA を適当

な制限酵素、例えば *EcoRI* を用いて完全分解する。生じた DNA 断片をクローニングベクター、例えば pUC118 (宝酒造社製) に挿入し、該組換えベクターにより適当な宿主菌、例えば *Escherichia*・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換する。この形質転換体を培養した後、プラスミド DNA を抽出する。*Escherichia*・コリおよび *Bacillus*・サブチルスにそれぞれ由来する s e c E 遺伝子に共通な領域の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを用いて、得られたプラスミド DNA から *Brevibacterium*・フラバム MJ-233 染色体に由来する挿入 A断片を確認し、取得することができる。このようにして得られる A断片の一つとして、上記 *Brevibacterium*・フラバム MJ-233 株の染色体 DNA を制限酵素 *EcoRI* により完全分解して得られる大きさ約 0.6 kb の DNA 断片が挙げられる。この大きさ約 0.6 kb の s e c E 遺伝子 DNA を含む DNA 断片を各種制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第 1 表に示す。

【0007】

【表 1】

第 1 表

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<i>Nsp</i> (7524) V	1	0.15, 0.45
<i>Nae</i> I	1	0.25, 0.35
<i>Pvu</i> II	1	0.55, 0.05

【0008】なお、本明細書においては、DNA 断片又はプラスミドを制限酵素により完全分解して得られた断片をそれ自体既知の方法に従い 1% アガロースゲル電気泳動および 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、これにより分離された断片数を制限酵素による「認識部位数」とした。また、「切断断片の大きさ」およびプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、*Escherichia*・コリのラムダファージ (λ phage) の DNA を制限酵素 *Hind* III で切断して得られる分子量既知の DNA 断片を試料に用いたと同一のアガロースゲルで泳動して得られる標準線に基づき、またはポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、*Escherichia*・コリのファイ・エックス 174 ファージ (φ x174 phage) の DNA を制限酵素 *Hae* III で切断して得られる分子量既知の DNA 断片を試料に用いたと同一ポリアクリルアミドゲルで泳動して得られる標準線に基づき、それぞれ切断 DNA 断片又はプラスミドの各 DNA 断片の大きさを算出した。プラスミドの大きさは各切断断片の大きさを加算して求めた。なお、各 DNA

断片の大きさを決定するさいに、大きさ 1 kb 以上の断片については 1% アガロースゲル電気泳動による値を採用し、大きさ 1 kb 未満の断片については 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動による値を採用した。

【0009】一方、上記 *Brevibacterium*・フラバム MJ-233 染色体 DNA を制限酵素 *EcoRI* で切断して得られる大きさ約 0.6 kb の DNA 断片については、その塩基配列をプラスミド pUC118 または pUC119 (宝酒造社製) を用いたジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法; Sanger, F. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977 参照) により決定した。該方法を用いて決定した上記 DNA 断片の塩基配列中に存在するオープンリーディングフレームを基に s e c E 遺伝子 DNA の塩基配列を決定したところ、該遺伝子 DNA は後記配列表の配列番号 1 に示す配列を有し、50 個のアミノ酸をコードする 150 塩基対から構成されていた。上記塩基配列を包含する本発明の A断片は、天然のコリネ型細菌染色体 DNA から分離された DNA のみならず、通常用いられる DNA 合

成装置、例えばベックマン社製システム1ープラス (System-1 Plus) を用いて合成したDNAであってもよい。また、上記手順によりプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得され、かつ蛋白質のトランスロケーションに関与する本発明の遺伝子DNAは、secE遺伝子産物の機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく、または削除されていてもよく、あるいは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらには塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが本発明の遺伝子DNAに包含されるものである。

【0010】本発明のA断片は、例えばエシェリヒア・コリ内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入し、該ベクターを用いてsecE遺伝子低温感受性変異菌株であるために20℃では生育不可能なエシェリヒア・コリPS163株 [EMBO Journal, 10 (No7), 1749-1757, 1991] を形質転換し、20℃培養における該菌株の生育を可能とする等の機能を有する。また本発明のA断片を、適当なプラスミド、例えばコリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でsecE遺伝子産物を高発現することが可能な組換えプラスミドを得ることができる。本発明で得られたsecE遺伝子を発現させるためのプロモーターとしては、例えばコリネ型細菌の保有するプロモーターを挙げることができるが、それに限られるものではなく、コリネ型細菌内で機能し、secE遺伝子の転写を開始させ得る塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0011】本発明のA断片を導入することが可能であり、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KEおよびpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611およびpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11等を挙げることができる。コリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とを共に有するベクターが特に好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、

pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KEおよびpCRY3KX等が好適に使用される。

【0012】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する手順を以下に示す。まず、プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IF012144 (FERMBP-2515) からプラスミドpBY503 (特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出する。次に、抽出されたDNAの一部を制限酵素XhoIで切断してプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含む大きさ約4.0 kbのDNA断片 (複製機能領域) を切り出し、また、抽出DNAの残余を制限酵素EcoRIおよびKpnIで切断してプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含む大きさ約2.1 kbのDNA断片 (安定化機能領域) をも切り出す。そして、これらの断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造社製) のEcoRI-KpnI部位及びSalI部位に常法により組み込むことで、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0013】本発明のA断片を上記に例示したプラスミドベクターに導入するには、例えば該プラスミドベクター中に認識部位を1カ所だけ有する制限酵素を用いて該プラスミドベクターを開裂させ、次に必要に応じて前記A断片および開裂したプラスミドベクターをS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするかまたは適当なアダプターDNAを添加した後、DNAリガーゼ処理により両者を連結させればよい。本発明のA断片をプラスミドpCRY30に導入するには、まずプラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIにより処理して1カ所で開裂させ、そこに前記secE遺伝子DNAを含むDNA断片 (A断片) をDNAリガーゼで連結させればよい。このようにして造成されたプラスミドpCRY30に本発明の大きさ約0.6 kbのA断片を導入した組換えプラスミドを、pCRY30-secEと命名した。プラスミドpCRY30-secEの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0014】本発明によるプラスミドで形質転換し得る宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERMBP-1497)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERMBP-1498)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERMBP-1499)、およびプレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERMBP-1500) 等が挙げられる。なお、上記のFERMBP-1498~1500株は全てFERMBP-1497を親株としており、FERMBP-1498株はDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール産化性株 (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)、FERMBP-1499株はD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株 (特開昭61-177993号公報参照)、およびFERMBP-1500株はL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株 (特開昭62-5198号公報参照) である。上記微生物の他に、プレバ

クテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同 ATCC13745、同 ATCC13746; プレバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020; プレバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869; コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831 等を宿主微生物として用いることもできる。

【0015】なお、宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、該菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のために形質転換が困難となる場合があるので、そのような場合には、該菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。プラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。宿主プレバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度、例えば0.2~50 µg/mlのアクリジンオレンジもしくはエチジウムブロミド等を含有する培地に1ml当り約10菌体の密度で該宿主菌を植菌し、その生育を不完全に阻害しながら約35℃で約24時間培養する。培養液を希釈して寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。得られたコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この一連の操作により、プラスミドpBY502が除去されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0016】上記操作により得られるプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株を前記プラスミドにより形質転換する方法としては、エシェリヒア・コリおよびエルビニア・カロトボラ (*Erwinia carotovora*) について知られているように [Calvin, N. M. および Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. および Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌にパルス波を通電する方法 [Sato, Y. ら, Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] 等を利用することができる。上記方法で形質転換して得られるsecE遺伝子産物産性能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地を用いて行うことができ、その際の炭素源として、例えばグルコース、エタノール、メタノールおよび蔗糖等を、そして窒素源として、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムおよび尿素等をそれぞ

れ単独で、もしくは混合して用いることができる。また、無機塩として、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等を用いることができる。この他にも、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等を栄養源として培地に添加してもよい。通常、培養は通気攪拌または振盪等の好気条件下に、約20~40℃、好ましくは約25℃~35℃の温度範囲で行う。培養中、培地のpHは5~10、好ましくは7~8付近に維持されることが望ましく、適当な酸又はアルカリを適宜培地に添加してpHを調整する。培養開始時における培地中の炭素源濃度は、好ましくは1~5重量%、更に好ましくは2~3重量%である。また、培養期間は通常1~7日間であるが、好ましくは2~5日間、最も好ましくは3日間である。かくして得られる培養物から遠心分離等により菌体を収集し、secE遺伝子産物を高率に含有する菌体を取得することができる。

【0017】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記実施例によりさらに具体的に説明する。

<実施例1>

プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のsecE遺伝子DNAを含むDNA断片(A断片)のクローニング

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を、半合成培地であるA培地 [組成: 尿素 2 g、(NH₄)₂SO₄ 7 g、K₂HPO₄ 0.5 g、KH₂PO₄ 0.5 g、MgSO₄ 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 6 mg、MnSO₄·4~6H₂O 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カザミノ酸 5 g、ビオチン 200 µg、塩酸チアミン 200 µg、グルコース 20 g を蒸留水に溶解して1 lとする] 1 l中で対数増殖期後期まで培養した後に菌体を回収した。得られた菌体を、リゾチームを10 mg/mlの濃度で含有する溶液 [組成: 10 mM NaCl、20 mM トリス緩衝液(pH 8.0)、1 mM EDTA·2Na] 15 mlに懸濁した。該懸濁液にプロテナーゼKを100 µg/mlの最終濃度で添加し、これを37℃で1時間インキュベートした。次に、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%となるように添加し、50℃で6時間インキュベートして溶菌させた。得られた溶菌液に等量のフェノール/クロホルム溶液を添加して室温で10分間穏やかに振盪した後、その全量を10~12℃で20分間、5,000×gの遠心分離に供し、その上清画分を分取した。該上清画分に酢酸ナトリウムをその濃度が0.3Mとなるように添加し、次いで2倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス

棒で撪め取り、これを70%エタノールで洗浄して風乾した。得られたDNAは、溶液〔組成：10mM トリス緩衝液（pH7.5）、1mM EDTA・2Na〕5mlを加えて4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0018】（B）組換えプラスミドpUC118-secEの創製

上記（A）項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液90μlを制限酵素EcoRI 50 unitsと37℃で1時間反応させて完全分解した。得られたDNA断片に、制限酵素EcoRIで切断した後に脱リン酸化処理したクローニングベクターpUC118（宝酒造社製）を混合した。この混合液に、それぞれの最終濃度が50mM トリス緩衝液（pH7.6）、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂、およびT4DNAリガーゼ1 unitとなるように各成分を添加し、4℃で15時間反応させてDNA断片とベクターを結合させた。得られたプラスミド混液を用いて、塩化カルシウム法（Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970 参照）によりエシェリヒア・コリJM109株（宝酒造社製）を形質転換し、アンピシリンを50mg含有する培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl5gおよび寒天16gを蒸留水に溶解して1lとする〕に塗抹した。

【0019】この培地上に生育した株を常法により液体培養し、その培養液よりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素により切断し、得られた断片をアガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、アガロースゲルよりDNAをナイロンメンブレンに移しとり、エシェリヒア・コリおよびバチルス・サブチルスにそれぞれ由来するsecE遺伝子に共通な領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。用いたプローブは、エシェリヒア・コリおよびバチルス・サブチルスに由来するsecE遺伝子から推定されるアミノ酸配列において特に相同性の高い領域に注目し、そ

のアミノ酸配列から想定された混合オリゴヌクレオチドプローブをアプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社製394 DNA/RNAシンセサイザーにより合成したプローブであった。実際に用いたプローブの塩基配列は、次のアミノ酸配列：

Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr

より想定される下記の塩基配列：

GAR GTI CGI AAR GTI ATY TGG CCI AC

（配列中、RはAまたはG、YはCまたはTを示し、ここでAはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミン、Iはデオキシイノシンを示す。）の26mer（塩基対）である。なお、プローブの合成にあたっては、デオキシイノシンを用いることで、混合の度合が著しく高くなることを回避した。

【0020】T4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製）を用いて、合成した上記オリゴヌクレオチドプローブの5'末端リン酸基を[γ-³²P] ATPによりラジオアイソトープラベルした〔Analytical Biochemistry, 158, 307-315, 1986〕。サザンハイブリダイゼーションは、常法〔Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)〕に従い実施した。この結果、ラジオアイソトープでラベルされたポジティブなバンドを生ずるクローンが選定されたが、該クローンはプラスミドpUC118の大きさ3.2kbのDNA断片に加えて、大きさ約0.6kbの挿入断片を有することが認められた。この大きさ約0.6kbの挿入DNA断片を各種の制限酵素で切断して認められた制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは、前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。また上記選定されたプラスミドを各種制限酵素で切断し、生じる切断断片の大きさを測定した。その結果を下記第2表に示す。

【0021】

【表2】

第2表 プラスミドpUC118-secE

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
BamHI	1	3.8
EcoRI	2	3.2, 0.6
PvuII	3	0.2, 0.8, 2.8

【0022】上記制限酵素の切断断片により特徴付けられるプラスミドを、pUC118-secEと命名した。

<実施例2>

secE遺伝子を含むDNA断片（A断片）の塩基配列の決定

実施例1（B）項で得られたsecE遺伝子DNAを含

む大きさ約0.6kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119（宝酒造社製）を用いたジデオキシヌクレオチド酵素法（dideoxy chain termination 法）（Sanger, F.ら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977）により、図2に示した戦略図に従って決定した。

【0023】<実施例3>

pUC118-secEプラスミドのエシェリヒア・コリ secE低温感受性変異株への導入

実施例1 (B) 項で得られたpUC118-secEプラスミドを用いて、エシェリヒア・コリのsecE低温感受性変異株であるPS163 (secEcs15)

[EMBO Journal, 10(Nº7), 1749-1757, 1991] を塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により形質転換し、これをアンピシリンを50 mg含有する寒天培地 [組成: トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 gおよび寒天 16 gを蒸留水に溶解して1 lとする] に塗抹し、20℃で培養した。A断片を挿入しない無処理のベクターのみをPS163株に導入した場合には20℃で培養して寒天培地上に生育する菌体は認められなかったのに対し、該株にpUC118-secEプラスミドを導入した場合には、DNA 1 µg当たり10⁴個以上の形質転換体を得られた。この結果、該プラスミド中にsecE遺伝子が挿入され、かつ該遺伝子DNAが供試菌体内で機能することが確認された。

【0024】<実施例4>

コリネ型細菌内で自律複製し安定なプラスミドベクター pCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレビアクテリウム・スタチオニス IF012144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載の方法に従い調製した。プレビアクテリウム・スタチオニス IF012144 を、半合成培地A培地 [組成: 尿素 2 g、(NH₄)₂SO₄ 7 g、K₂HPO₄ 0.5 g、KH₂PO₄ 0.5 g、MgSO₄ 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 6 mg、MnSO₄·4~6H₂O 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カザミノ酸 5 g、ピチオン 200 µg、塩酸チアミン 200 µg、グルコース 20 gを蒸留水に溶解して1 lとする] 1 l中で対数増殖期後期まで培養した後、菌体を収集した。得られた菌体を、リゾチームを10 mg/mlの濃度で含有する緩衝液 [組成: 25 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10 mM EDTA、50 mM グルコース] 20 mlに懸濁して、37℃で1時間反応させた。この反応液にアルカリ-SDS液 [組成: 0.2 N NaOH、1% (W/V) SDS] 40 mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5 M 酢酸カリウム溶液 60 ml、酢酸 11.5 ml、蒸留水 28.5 mlの混合液] 30 mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0025】得られた溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離に供し、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム=1:1混和液) を加えて

懸濁した後、再び全量を遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離に供して、その水層を回収した。得られた水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置した後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。得られた沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液 [組成: 10 mM トリス、1 mM EDTA; 塩酸にてpHを8.0に調整] 2 mlに溶解した。該溶解液に塩化セシウム溶液 [組成: 5倍濃度のTE緩衝液100 mlに塩化セシウム170 gを溶解した] 15 mlおよび10 mg/ml 濃度のエチジウムブロマイド溶液1 mlを添加し、該液の密度を1.392 g/mlに調整した。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離に供した。

【0026】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方に位置するバンドとして見出しされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとり、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に、最終濃度が30 mMとなるように3M 酢酸ナトリウム溶液を添加した後、2倍量のエタノールを添加し、-20℃で1時間静置した。該液を15,000×gで遠心分離してDNAを沈降させ、これを回収してプラスミドpBY503 50 µgを得た。

【0027】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298 (宝酒造社製) 0.5 µgと制限酵素Sal I 5 units を37℃で1時間反応させて、プラスミドDNAを完全分解した。また、前記

(A) 項で調製したプラスミドpBY503 2 µgと制限酵素Xho I 1 unit を37℃で30分間反応させてプラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、その混合液を65℃で10分間加熱処理して液中の制限酵素を失活させた後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM MgCl₂、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATPおよびT4 DNAリガーゼ 1 unit となるように各成分を強化し、16℃で15時間インキュベートした。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル (宝酒造社製) を形質転換した。形質転換菌体を、各々最終濃度で30 µg/mlのカナマイシン、100 µg/mlのIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)、100 µg/mlのX-gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)を含むL培地 [組成: トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、NaCl 5 gを蒸留水に溶解して1 lとする、pH 7.2] を用いて37℃で24時間培養した。

上記培地上に生育した生育株のうち、白いコロニーを形成して生育してきた株を選択し、各々の株からプラスミドをアルカリ-SDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning (1982), 90-91 参照] により抽出した。以上の手順により、プラスミド p HSG 298 の Sa I 認識部位にプラスミド p BY 503 に由来する大きさ約 4.0 kb の断片が挿入されたプラスミド p HSG 298-or i が得られた。同様の方法を用いて、前記 (A) 項で得られたプラスミド p BY 503 を制限酵素 Kp n I 及び Ec o R I で処理して得られる大きさ約 2.1 kb の DNA 断片を上記プラスミド p HSG 298-or i の Kp n I 及び Ec o R I 認識部位にクローニングし、プラスミドベクター p CRY 30 を調製した。

【0028】<実施例5>

プラスミド p CRY 30-sec E の調製およびコリネ型細菌への導入

実施例 1 (C) 項で得られたプラスミド p UC 118-sec E 5 µg を制限酵素 Ec o R I 5 units と 37℃ で 1 時間反応させて得られたプラスミド分解物、ならびに実施例 3 (B) 項で得られたプラスミド p CRY 30 1 µg を制限酵素 Ec o R I 1 unit と 37℃ で 1 時間反応させて得られたプラスミド分解物を混合した。この混合液に、それぞれの最終濃度が 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl₂、T4 DNA リガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、12℃ で 15 時間反応させて双方のプラスミド分解物を結合させた。得られた結合プラスミドを用い、前記方法に従ってエシェリヒア・コリ JM109 株を形質転換し、これをカナマイシンを 50 µg/ml 含む培地 [組成: トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g および寒天 16 g を蒸留水に溶解して 1 l とする] に塗抹した。

【0029】この培地上に生育してきた株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出した。抽出プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド p CRY 30 の大きさ 8.6 kb の DNA 断片に加え、大きさ 0.6 kb の挿入 DNA 断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミド DNA を用いて、コリネ型細菌を形質転換した。形質転換は、電気パルス法を用いて下記の如く行った。プレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) のプラスミド p BY 502 除去株を前記 A 培地 100 ml 中で対数増殖期初期まで培養し、これにペニシリン G を最終濃度で 1 unit/ml となるように添加して、さらに 2 時間振盪培養した。培養物を遠心分離にかけて菌体を収集し、得られた菌体をパルス用溶液 [組成: 272 mM シュークロース、7 mM KH₂PO₄、1 mM MgCl₂; pH 7.4] 20 ml にて洗浄した。洗浄後、再び遠心分離して菌体を収集し、この菌体を前記パルス用溶液 5 ml に懸濁した。該懸濁液 0.75 ml を前記手順により得たプラスミド DNA 溶液 50 µl と混合し、水中に 20 分間静置した後、ジーンパルサー (バイオラド社製) のパルス条件を 2500 ボルト、25 µFD に設定し、該装置により前記混合液にパルスを印加した。パルス加印後、この混合液を氷中に 20 分間静置した。次いで、該液の全量を前記 A 培地 3 ml に移し、30℃ にて 1 時間培養した。さらに、培養菌体を最終濃度 15 µg/ml のカナマイシンを含有する前記 A 寒天培地に植菌し、30℃ で 2~3 日間培養した。前記実施例 3 (A) 項に記載の方法を用いて、出現したカナマイシン耐性株よりプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断し、その切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第 3 表に示す。

【0030】

【表3】

第3表 プラスミド p CRY 30-sec E

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<u>S</u> ph I	3	5.5, 2.1, 1.7
<u>E</u> c o R I	2	8.7, 0.6
<u>P</u> st I	2	7.6, 1.7
<u>B</u> am H I	1	9.3
<u>K</u> p n I	1	9.3

【0031】上記制限酵素の切断断片により特徴付けられるプラスミドを、p CRY 30-sec E と命名した。なお、プラスミド p CRY 30-sec E により形質転換されたプレバクテリウム・フラバム MJ 233-sec E は、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成 5 年 3 月 9 日付

で受託番号: FERM P-13517 として寄託されている。

【0032】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 150

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-150

特徴を決定した方法：E

配列

GTG GGA GAA GTC CGT AAG GTT ATT TGG CCT ACT GCG CGC CAG ATG GTC ACG TACV
al Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln Met Val Thr Tyr
1 5 10 15
ACC CTT GTG GTT TTG GGA TTT TTG ATT GTT TTG ACC GCT TTG GTG TCT GGT GTGT
hr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Val Ser Gly Val
20 25 30 35
GAT TTC CTA GCT GGT CTT GGA GTT GAG AAG ATT CTG ACT CCG TAG
Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Val Glu Lys Ile Leu Thr Pro
40 45 50

【図面の簡単な説明】

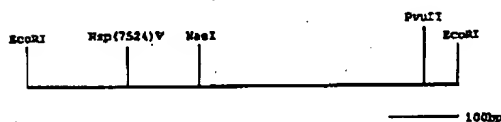
【図1】本発明で得られた secE 遺伝子 DNA を含む DNA 断片の制限酵素による切断点地図である。

【図2】本発明で得られた secE 遺伝子 DNA を含

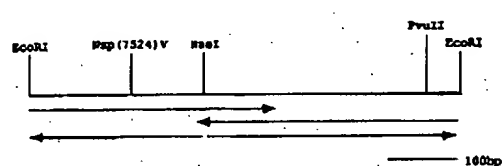
む、大きさ約 0.6 kb の DNA 断片の塩基配列を決定する戦略図である。

【図3】本発明で得られたプラスミド pCRY30-secE の制限酵素による切断点地図である。

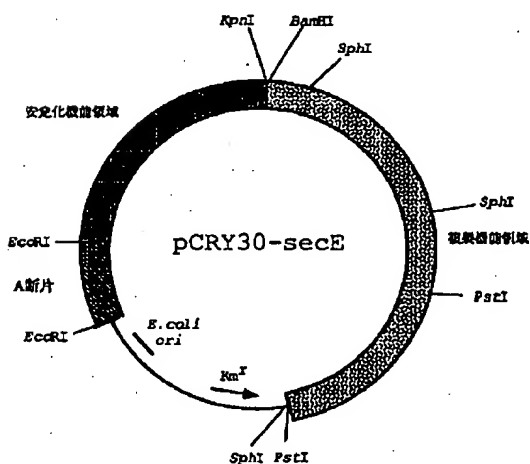
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.